

Best Available Copy

PCT/JP 2004/017779

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月 2日
Date of Application:

出願番号 特願2003-403350
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-403350]

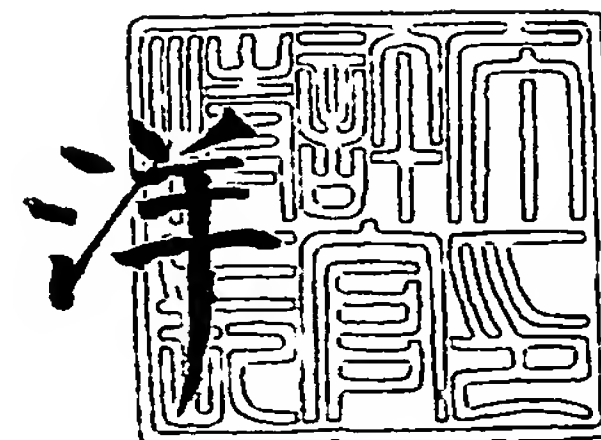
出願人 ダイキン工業株式会社
Applicant(s):

Best Available Copy

2005年 1月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3123017

【書類名】 特許願
【整理番号】 190941
【提出日】 平成15年12月 2日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 22/53
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 3 番地 株式会社ダイキン環境研究所内
 【氏名】 ▲高▼橋 淳子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 3 番地 株式会社ダイキン環境研究所内
 【氏名】 加藤 千明
【特許出願人】
 【識別番号】 000002853
 【住所又は居所】 大阪府大阪市北区中崎西 2 丁目 4 番 1 2 号梅田センタービル
 【氏名又は名称】 ダイキン工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100062144
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 青山 葆
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100103230
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高山 裕貢
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【選任した代理人】
 【識別番号】 100087114
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 齋藤 みの里
 【電話番号】 06-6949-1261
 【ファクシミリ番号】 06-6949-0361
【国等の委託研究の成果に係る記載事項】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 5 年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「基盤技術研究促進事業（民間基盤技術研究支援制度）／環境化学物質の簡易型化学物質推定・毒性評価システム」、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 013262
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0307180

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための方法であって、被検試料の存在下に微生物の遺伝子破壊株を培養し、その化学物質に対する細胞応答を指標に用いることを特徴とする方法。

【請求項 2】

化学物質に対する細胞応答が細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性および／または遺伝子発現の変化である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

遺伝子発現の変化を測定する方法が、RNA量またはmRNA量の測定である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

遺伝子発現の変化を測定する方法が、特定遺伝子の発現の変化を測定するプロモーターアッセイである請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

微生物が酵母である、請求項 1 から 4 までのいずれか記載の方法。

【請求項 6】

破壊される遺伝子が、公的データベース：MIPSの分類に従い、

代謝 (01) のアミノ酸代謝 (01.01)、窒素および硫黄代謝 (01.02)、ヌクレオチド代謝 (01.03)、リン酸代謝 (01.04)、C-化合物および炭水化物代謝 (01.05)、脂質、脂肪酸およびイソプロパノイド代謝 (01.06)、ビタミン、コファクターおよび補欠分子族の代謝 (01.07) ;

細胞周期とDNAプロセッシング (03) のDNAプロセッシング (03.01)、細胞周期 (03.03) ;

転写 (04) のmRNA 転写 (04.05)、RNA 輸送 (04.07) ;

蛋白合成 (05) のリボソーム生合成 (05.01)、翻訳制御 (05.07) ;

蛋白フェイト (06) の蛋白ターゲッティング、局在、転位 (06.04)、蛋白修飾 (06.07)、蛋白複合体のアセンブル (06.10)、蛋白分解的崩壊 (06.13) ;

細胞内輸送と輸送機構 (08) の核輸送 (08.01)、小胞輸送 (ゴルジネットワーク他.) (08.07)、液胞輸送 (08.13)、細胞移入 (08.19)、細胞骨格輸送 (08.22)、他の細胞内輸送活性 (08.99) ;

細胞レスキュー、防御と病原性 (11) のストレス応答 (11.01)、解毒 (11.07) ;

細胞内環境調節／相互作用 (13) のイオン性ホメオスタシス (13.01)、細胞感受性と応答 (13.11) ;

細胞フェイト (14) の細胞成長 / 形態形成 (14.01)、細胞分化 (14.04) ;

細胞組織の制御 (30) の細胞壁 (30.01)、細胞骨格 (30.04)、核 (30.10)、ミトコンドリア (30.16) ;

輸送促進 (67) のイオントランスポーター (67.04)、ビタミン/コファクタートランスポーター (67.21)、輸送機構 (67.50)、他の輸送促進 (67.99) ;

未分類 (98) ; および／または

未分類蛋白 (99) に分類される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

破壊される遺伝子が液胞に関与している、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

破壊される代謝 (01) 遺伝子がYGL026C、YGR180C、YDR127W、YCR028C、YLR284C、YOR221C、YAL021C、YGL224C、YBL042C、YDR148C、YHL025W、YLR307W、YLR345W、YLR354C、YPL129W、YPR060Cである請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

破壊される細胞周期とDNAプロセッシング (03) 遺伝子がYGR180C、YDR150W、YGL240W、YBL058W、YIL036W、YLR226W、YLR381W、YOR026W、YPL018W、YBL063W、YDR363W-A、YIRO

26C、YLR234W、YMR032W、YPL129Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 0】

破壊される転写(04)遺伝子がYGR006W、YIL036W、YKR082W、YLR226W、YML112W、YMR021C、YAL021C、YDR195W、YOL068C、YBR279W、YGL070C、YGL071W、YGL222C、YHL025W、YLR266C、YPL129Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 1】

破壊される蛋白合成(05)遺伝子がYBL058W、YLR287C-A、YGR084C、YLR344Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 2】

破壊される蛋白フェイト(06)遺伝子がYKL080W、YLR447C、YGL240W、YGR105W、YGL206C、YKL119C、YDR414C、YHR060W、YLR292C、YLR306W、YGL227W、YGR270Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 3】

破壊される細胞内輸送と輸送機構(08)遺伝子がYPR036W、YDR027C、YHR039C、YKL080W、YLR447C、YGL206C、YKR082W、YLR292C、YBL063Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 4】

破壊される解毒(11)遺伝子がYJR104C、YMR021Cである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 5】

破壊される細胞内調節／相互作用(13)遺伝子がYPR036W、YHR039C-B、YKL080W、YLR447C、YGL071W、YIR026Cである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 6】

破壊される細胞フェイト(14)遺伝子がYDL151C、YBL058W、YKR082W、YDL151C、YOL068C、YDR363W-A、YHL025W、YIR026C、YLR307W、YMR032W、YPL129Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 7】

破壊される細胞組織の制御(30)遺伝子がYDR027C、YDR414C、YLR381W、YGR084C、YMR032Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

破壊される輸送促進(67)遺伝子がYPR036W、YHR026W、YHR039C、YKL080W、YLR447C、YCR028C、YLR292Cである請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 9】

破壊される未分類(98)遺伝子がYBL056Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 2 0】

破壊される未分類蛋白(99)遺伝子がYDR149C、YLR285W、YLR311C、YOR331C、YPR123C、YDR525W-A、YDR539W、YDR540C、YGL246C、YJL204C、YLR282C、YLR287C、YLR290C、YJL188C、YJL192C、YJL211C、YKL037W、YLR283W、YLR312C、YLR315W、YLR320W、YPL030Wである請求項 6 記載の方法。

【請求項 2 1】

被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するために使用される、微生物の遺伝子破壊株を含むキット。

【請求項 2 2】

被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための、微生物の遺伝子破壊株を含む組成物。

【請求項 2 3】

被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための、微生物の遺伝子破壊株の使用。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子破壊株を用いた化学物質検定方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は環境中の試料中に存在する化学物質を検定する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

人類がこれまでに作りだした化学物質は膨大な数にのぼり、さらに年々新しい化学物質が開発されている。これら化学物質は現代生活のあらゆる面で利用され、人類の生活向上に役立っている。その反面、化学物質の中には、その製造、流通、使用、廃棄等の様々な段階で環境中に放出され、環境での残留、食物連鎖による生物学的濃縮などを通じ、人の健康や生態系に有害な影響を及ぼすものがあり、環境汚染は社会問題化している。よって、化学物質について人体や生態系に与える影響を評価する要請がある。

被検試料中に存在する化学物質を検出する場合、検出システムの検出感度を向上させることは非常に重要である。被検試料中に低濃度の化学物質しか存在しない場合、低濃度の化学物質を検出するために用いる検出システムの検出感度に応じ、被検試料を濃縮しなければならない。しかし、環境試料のような水溶液の濃縮を行うには濃縮装置必要となる。また、対象とする化学物質が揮発性の場合、濃縮操作により化学物質が消失してしまうことがある。このため、できるかぎり濃縮操作の必要が無い検出システム、すなわち高い検出感度を有するアッセイ系が望まれる。

環境中に存在する化学物質の検出に酵母細胞の毒性応答を利用するアッセイ系がある（特許文献1および2）。

【0 0 0 3】

【特許文献1】 W0 03/018792

【特許文献2】 特開2003-061676

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

本発明者らは、これまで上記特許文献1および2に示すように化学物質によって誘導される遺伝子情報を蓄積し、酵母細胞の毒性応答を利用したバイオアッセイ法を検討してきた。バイオアッセイによる化学物質の検出感度は指標とする細胞や生物の化学物質に対する感受性に依存する。従って、酵母細胞の毒性応答を利用したバイオアッセイ法において、より高感度のシステムを構築するためには、より感受性の高い酵母細胞を利用する必要がある。そこで、酵母の遺伝子 6 0 0 0 種類の遺伝子破壊株の中でホモ接合の 2 倍体として生育可能な遺伝子破壊株約 4 8 0 0 種類の遺伝子破壊株の中から、化学物質検出のアッセイ系に適した化学物質感受性を有する遺伝子破壊株を選択した。

本発明は、微生物の毒性応答を利用したバイオアッセイ法において、より高感度の方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

即ち、本発明は、

(1) 被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための方法であって、被検試料の存在下に微生物の遺伝子破壊株を培養し、その化学物質に対する細胞応答を指標に用いることを特徴とする方法、好ましくは、

化学物質に対する細胞応答が細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性および／または遺伝子発現の変化である方法、さらに好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、RNA量またはmRNA量の測定である方法、より好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、特定遺伝子の発現の変化を測定するプロモーターアッセイである方法、

【0 0 0 6】

(2) 微生物が酵母である、上記(1)の方法、好ましくは、破壊される遺伝子が、公的データベース:MIPSの分類に従い、代謝(01)のアミノ酸代謝(01.01)、窒素および硫黄代謝(01.02)、ヌクレオチド代謝(01.03)、リン酸代謝(01.04)、C-化合物および炭水化物代謝(01.05)、脂質、脂肪酸およびイソプロパノイド代謝(01.06)、ビタミン、コファクターおよび補欠分子族の代謝(01.07) ;

細胞周期とDNAプロセッシング(03)のDNAプロセッシング(03.01)、細胞周期(03.03) ;

転写(04)のmRNA転写(04.05)、RNA輸送(04.07) ;

蛋白合成(05)のリボソーム生合成(05.01)、翻訳制御(05.07) ;

蛋白フェイト(06)の蛋白ターゲットティング、局在、転位(06.04)、蛋白修飾(06.07)、蛋白複合体のアセンブル(06.10)、蛋白分解的崩壊(06.13) ;

細胞内輸送と輸送機構(08)の核輸送(08.01)、小胞輸送(ゴルジネットワーク他.) (08.07)、液胞輸送(08.13)、細胞移入(08.19)、細胞骨格輸送(08.22)、他の細胞内輸送活性(08.99) ;

細胞レスキュー、防御と病原性(11)のストレス応答(11.01)、解毒(11.07) ;

細胞内環境調節/相互作用(13)のイオン性ホメオスタシス(13.01)、細胞感受性と応答(13.11) ;

細胞フェイト(14)の細胞成長/形態形成(14.01)、細胞分化(14.04) ;

細胞組織の制御(30)の細胞壁(30.01)、細胞骨格(30.04)、核(30.10)、ミトコンドリア(30.16) ;

輸送促進(67)のイオントランスポーター(67.04)、ビタミン/コファクタートランスポーター(67.21)、輸送機構(67.50)、他の輸送促進(67.99) ;

未分類(98) ; および/または

未分類蛋白(99)に分類される方法、さらに好ましくは、破壊される遺伝子が下記表2の機能に関与している方法、より好ましくは、破壊される遺伝子が液胞に関与している、例えば酵母の場合、具体的には以下に示すYP R036W、YDR027C、YHR026W、YHR039C-A、YKL080W、YLR447C、YGR105W、YKL119C、YHR060Wである方法、

【0 0 0 7】

さらに具体的には破壊される遺伝子が以下のものである方法:

- (2-1) 代謝(01)遺伝子であるYGL026C、YGR180C、YDR127W、YCR028C、YLR284C、YOR221C、YAL021C、YGL224C、YBL042C、YDR148C、YHL025W、YLR307W、YLR345W、YLR354C、YPL129W、YPR060C ;
- (2-2) 細胞周期とDNAプロセッシング(03)遺伝子であるYGR180C、YDR150W、YGL240W、YBL058W、YIL036W、YLR226W、YLR381W、YOR026W、YPL018W、YBL063W、YDR363W-A、YIR026C、YLR234W、YMR032W、YPL129W ;
- (2-3) 転写(04)遺伝子であるYGR006W、YIL036W、YKR082W、YLR226W、YML112W、YMR021C、YAL021C、YDR195W、YOL068C、YBR279W、YGL070C、YGL071W、YGL222C、YHL025W、YLR266C、YPL129W ;
- (2-4) 蛋白合成(05)遺伝子であるYBL058W、YLR287C-A、YGR084C、YLR344W ;
- (2-5) 蛋白フェイト(06)遺伝子であるYKL080W、YLR447C、YGL240W、YGR105W、YGL206C、YKL119C、YDR414C、YHR060W、YLR292C、YLR306W、YGL227W、YGR270W ;
- (2-6) 細胞内輸送と輸送機構(08)遺伝子であるYPR036W、YDR027C、YHR039C、YKL080W、YLR447C、YGL206C、YKR082W、YLR292C、YBL063W ;
- (2-7) 解毒(11)遺伝子であるYJR104C、YMR021C ;
- (2-8) 細胞内調節/相互作用(13)遺伝子であるYPR036W、YHR039C、YKL080W、YLR447C、YGL071W、YIR026C ;
- (2-9) 細胞フェイト(14)遺伝子であるYDL151C、YBL058W、YKR082W、YDL151C、YOL0

68C、YDR363W-A、YHL025W、YIR026C、YLR307W、YMR032W、YPL129W；

(2-10) 細胞組織の制御(30)遺伝子であるYDR027C、YDR414C、YLR381W、YGR084C、YMR032W；

(2-11) 輸送促進(67)遺伝子であるYPR036W、YHR026W、YHR039C、YKL080W、YLR447C、YCR028C、YLR292C；

(2-12) 未分類(98)遺伝子であるYBL056W；または

(2-13) 未分類蛋白(99)遺伝子であるYDR149C、YLR285W、YLR311C、YOR331C、YPR123C、YDR525W-A、YDR539W、YDR540C、YGL246C、YJL204C、YLR282C、YLR287C、YLR290C、YJL188C、YJL192C、YJL211C、YKL037W、YLR283W、YLR312C、YLR315W、YLR320W、YPL030W、

【0008】

(3) 酵母以外の微生物であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される遺伝子に相当する遺伝子である上記(1)の方法、

【0009】

(4) 被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するために使用される、微生物の遺伝子破壊株を含むキット、好ましくは、

化学物質に対する細胞応答が細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性および／または遺伝子発現の変化であるキット、さらに好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、RNA量またはmRNA量の測定であるキット、より好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、特定遺伝子の発現の変化を測定するプロモーターアッセイであるキット、

(5) 微生物が酵母であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される、上記(4)のキット、および酵母以外の微生物であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される遺伝子に相当する遺伝子である上記(4)のキット、

【0010】

(6) 被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための、微生物の遺伝子破壊株を含む組成物、好ましくは、

化学物質に対する細胞応答が細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性および／または遺伝子発現の変化である組成物、さらに好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、RNA量またはmRNA量の測定である組成物、より好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、特定遺伝子の発現の変化を測定するプロモーターアッセイである組成物、

(7) 微生物が酵母であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される、上記(6)の組成物、および酵母以外の微生物であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される遺伝子に相当する遺伝子である上記(6)の組成物、および

(8) 被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための、微生物の遺伝子破壊株の使用、好ましくは、

化学物質に対する細胞応答が細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性および／または遺伝子発現の変化である使用、さらに好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、RNA量またはmRNA量の測定である使用、より好ましくは、

遺伝子発現の変化を測定する方法が、特定遺伝子の発現の変化を測定するプロモーターアッセイである使用、

(9) 微生物が酵母であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される、上記(8)の使用、および酵母以外の微生物であり、破壊される遺伝子が上記(2)にて規定される遺伝子に相当する遺伝子である上記(8)の使用、に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、被検試料中に低濃度の化学物質しか存在しない場合であっても、好適に化学

物質を検出できる、高感度のアッセイ系である。本発明のアッセイ系を用いれば、被検試料を濃縮する必要がなく、また対象とする化学物質が揮発性の場合であっても好適に化学物質を検出できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

1) 遺伝子破壊株の選別とその機能分類

酵母遺伝子破壊株として用いたYeast Deletion Homozygous Diploid (YKO Plate sets: Yeast Deletion Homozygous Diploid complete set, ResGenTM, Invitrogen) の遺伝子破壊株 4 8 0 0 種類の中から、化学物質に良好な感受性を示す株84種を選別した（実施例 1）。この84種の株の破壊遺伝子を公的データベース：MIPS (Munich Information center for Protein Sequences) の分類に従い、分類した。なお、MIPSの分類とは遺伝子をその機能により分類したものであり、以下のURLにてその情報は容易に入手できる：http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/searchCatalogFirstAction.do?style=catalog.xslt&table=FUNCTIONAL_CATEGORIES

MISPの分類によれば、酵母遺伝子は以下の表のように分類されている。

表 1

【表 1-1】

01 .. 代謝
01.01 .. アミノ酸代謝
01.02 .. 窒素および硫黄代謝
01.03 .. ヌクレオチド代謝
01.04 .. リン酸代謝
01.05 .. C-化合物および炭水化物代謝
01.06 .. 脂質、脂肪酸およびイソプロパノイド代謝
01.07 .. ビタミン、コファクターおよび補欠分子族の代謝
01.20 .. 二次代謝
02 .. エネルギー
02.01 .. 解糖および糖新生
02.07 .. ペントースリン酸回路
02.10 .. トリカルボン酸経路 (クエン酸回路, クレブス回路, TCA回路)
02.11 .. 電子伝達および膜関連エネルギー保存
02.13 .. 呼吸
02.16 .. 発酵
02.19 .. エネルギー保存の代謝 (例えば、グリコーゲン, トレハロース)
02.22 .. グリオキシル酸回路
02.25 .. 脂肪酸の酸化
02.99 .. 他のエネルギー発生活性
03 .. 細胞周期とDNAプロセッシング
03.01 .. DNAプロセッシング
03.03 .. 細胞周期
03.99 .. 他の細胞分裂とDNA合成活性
04 .. 転写
04.01 .. rRNA 転写
04.03 .. tRNA 転写
04.05 .. mRNA 転写
04.07 .. RNA 輸送
04.99 .. 他の転写活性
05 .. 蛋白合成
05.01 .. リボソーム生合成
05.04 .. 翻訳
05.07 .. 翻訳制御
05.10 .. アミノアシル-tRNA-シンセターゼ

【表 1-2】

10 .. 細胞伝達/シグナル伝達機構
10.01 .. 細胞内シグナリング
10.05 .. 膜貫通シグナル伝達
11 .. 細胞レスキュー, 防御と病原性
11.01 .. ストレス応答
11.07 .. 解毒
11.10 .. 外来化合物の分解
11.99 .. 他の細胞レスキュー活性
13 .. 細胞内環境調節/相互作用
13.01 .. イオン性ホメオスタシス
13.11 .. 細胞感受性と応答
14 .. 細胞フェイト
14.01 .. 細胞成長 / 形態形成
14.04 .. 細胞分化
14.10 .. 細胞死
14.20 .. 細胞加齢
29 .. 転位性要素、ウイルスおよびプラスミド蛋白
29.07 .. トランスポゾン移動の統合または阻害に必要な蛋白
29.99 .. 他の転位性要素、ウイルスおよびプラスミド蛋白
30 .. 細胞組織の制御
30.01 .. 細胞壁
30.02 .. 原形質膜
30.03 .. 細胞質
30.04 .. 細胞骨格
30.05 .. 中心体
30.07 .. 小胞体
30.08 .. ゴルジ
30.09 .. 細胞内輸送小胞
30.10 .. 核
30.16 .. ミトコンドリア
30.19 .. ペルオキシソーム
30.22 .. エンドソーム
30.25 .. 液胞またはリソソーム
30.99 .. 細胞組織の他の制御
40 .. 細胞内局在

【表1-3】

62 .. 蛋白活性調節
62.01 .. 調節の機構
62.02 .. 調節の標的
63 .. 結合機能を有する蛋白またはコファクター必要素（構造または触媒的）
63.01 .. 蛋白結合
63.03 .. 核酸結合
63.09 .. 脂質結合
67 .. 輸送促進
67.01 .. チャネル / 細孔クラストランスポーター
67.04 .. イオントランスポーター
67.07 .. C-化合物と炭水化物トランスポーター
67.10 .. アミノ酸トランスポーター
67.11 .. ペプチドトランスポーター
67.13 .. 脂質トランスポーター
67.16 .. ヌクレオチドトランスポーター
67.19 .. アラントインおよび アラントエートトランスポーター
67.21 .. ビタミン/コファクタートランスポーター
67.28 .. 薬物トランスポーター
67.50 .. 輸送機構
67.99 .. 他の輸送促進
98 .. 未分類
99 .. 未分類蛋白

【0013】

化学物質に良好な感受性を示す選別した株84種を上記公的データベース：MIPSの分類に従い、分類した。

表2. 機能による分類

化学物質感受性 84 遺伝子破壊株の遺伝子の機能分類

【表 2-1】

機能	No	遺伝子	MIPS分類	機能(description)
代謝 01 ... METABOLISM	DEL003	YGL026C	01.01.01	トリプトファンシンターゼ: tryptophan synthase
	DEL004	YGR180C	01.03.07	リボヌクレオチドリダクターゼ 小サブユニット: ribonucleotide reductase small subunit
	DEL009	YDR127W	01.01.01	アロムペンタファンクショナル酵素: arom pentafunctional enzyme
	DEL016	YCR028C	01.02.04 01.05.04 01.06.10 01.07.10	パントテン酸パーミアーゼ: Pantothenate permease
	DEL023	YLR284C	01.06.04	デルタ3-シス-デルタ2-トランス-エノイル-CoA イソメラーゼ: delta3-cis-delta2-trans-enoyl-CoA isomerase
	DEL028	YOR221C	01.06.07	マロニル-CoA:ACP トランスフェラーゼ: malonyl-CoA:ACP transferase
	DEL031	YAL021C	01.05.04	転写調節因子: transcriptional regulator
	DEL038	YGL224C	01.03.04	ピリミジン 5-ヌクレオチターゼ: pyrimidine 5-nucleotidase
	DEL052	YBL042C	01.03.04	ウリジンパーミアーゼ: Uridine permease
	DEL056	YDR148C	01.05.01	2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体 E2 成分: 2-oxoglutarate dehydrogenase complex E2 component
	DEL064	YHL025W	01.05.04	全転写活性因子: Global transcription activator
	DEL073	YLR307W	01.05.01	胞子形成-キチンデアセチラーゼ: sporulation-specific chitin deacetylase

【表2-2】

	DEL082	YPL129W	01.04.04 01.05.04	TFIIFサブユニット(転写イニシエーション因子), 30 kD : TFIIFsub unit (transcription initiation factor), 30 kD
	DEL083	YPR060C	01.01.01	コリスミ酸ムターゼ: chorismate mutase
細胞周期と DNA合成 03... CELL CYCLE AND D NA PROCESSI NG	DEL004	YGR180C	03.01.03	リボヌクレオチドリダクターゼ 小サブユニット: ribonucleotide reductase small subunit
	DEL010	YDR150W	03.03.01	核遊走タンパク: nuclear migration protein
	DEL011	YGL240W	03.03.01	後期促進因子成分: component of the anaphase promoting complex
	DEL015	YBL058W	03.03.01 03.03.02	Glc7p ポテンシャル調節サブユニット: potential regulatory subunit for Glc7p
	DEL019	YIL036W	03.01.03	ATF/CREB 活性因子: ATF/CREB activator
	DEL022	YLR226W	03.03.01	CDK-サイクリン分岐化複合体: divergent CDK-cyclin complex
	DEL048	YLR381W	03.03.04.05	アウターキネトコアタンパク: outer kinetochore protein
	DEL050	YOR026W	03.03.01	細胞周期制止タンパク: cell cycle arrest protein
	DEL051	YPL018W	03.03.04.05	アウターキネトコアタンパク: outer kinetochore protein
	DEL054	YBL063W	03.03.01	キネシン関連タンパク: kinesin-related protein
	DEL057	YDR363W-A	03.03.01	エクソサイトーシス, 仮性菌糸分化調節: regulator of exocytosis and pseudohyphal differentiation
	DEL065	YIR026C	03.03.02	チロシンフォスファターゼ: Protein tyrosine phosphatase
	DEL070	YLR234W	03.03.01	DNAトポイソメラーゼIII: DNA topoisomerase III

【表 2-3】

	DEL082	YPL129W	03.03.01	TFIIF サブユニット (転写イニシエーション因子), 30 kD : TFIIF subunit (transcription initiation factor), 30 kD
転写 04 .. TRANS CRIPTION	DEL012	YGR006W	04.05.05.01	U5 snRNA-関連タンパク質 : U5 snRNA-associated protein
	DEL019	YIL036W	04.05.01.04	ATF/CREB 活性因子 : ATF/CREB activator
	DEL021	YKR082W	04.07	核膜孔タンパク : nuclear pore protein
	DEL022	YLR226W	04.05.01.04	CDK-サイクリン分岐化複合体 : divergent CDK-cyclin complex
	DEL026	YML112W	04.05.01.04	カルボキシル末端ドメイン (CTD) キナーゼ、 γ サブユニット : carboxy-terminal domain (CTD) kinase, gamma subunit
	DEL027	YMR021C	04.05.01.04	金属結合活性因子 : metal binding activator
	DEL031	YAL021C	04.05.01.04	転写調整因子 : transcriptional regulator
	DEL033	YDR195W	04.05.05	RNA 3'末端 形成タンパク質 : RNA 3'-end formation protein
	DEL049	YOL068C	04.05.01.04	遺伝子抑制タンパク質 : silencing protein
	DEL055	YBR279W	04.05.01.04	DNA依存性 RNA ポリメラーゼ II 調節因子 : DNA-directed RNA polymerase II regulator
	DEL058	YGL070C	04.05.01.01	DNA依存性 RNA ポリメラーゼ II, 14.2 KD サブユニット : DNA-directed RNA polymerase II, 14.2 KD subunit
	DEL059	YGL071W	04.05.01.04	鉄調節転写抑制因子 : iron-regulated transcriptional repressor
	DEL060	YGL222C	04.05.05.03	mRNA ディキャッピング促進 : stimulates mRNA decapping

【表 2-4】

	DEL082	YPL129W	04.05.01.01	TFIIFサブユニット (転写イニシエーション因子), 30 kD : TFIIF subunit (transcription initiation factor), 30 kD
蛋白合成 05 ... PROTEIN SYNTHESIS	DEL015	YBL058W	05.07	Glc7p ポテンシャル調節サブユニット: potential regulatory subunit for Glc7p
	DEL044	YLR287C-A	05.01	40S 小サブユニットリボソームタンパク: 40S small subunit ribosomal protein
	DEL062	YGR084C	05.01	ミトコンドリアリボソームタンパク、小サブユニット: mitochondrial ribosomal protein, small subunit
	DEL077	YLR344W	05.01	60S 大サブユニットリボソームタンパク: 60S large subunit ribosomal protein
蛋白フェイト (ホールディング、修飾、デスティネーション) 06 ... PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	DEL007	YKL080W	06.10	液胞H ⁺ -ATPアーゼ V1 ドメイン 42 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V1 domain 42 KD subunit, vacuolar
	DEL008	YLR447C	06.10	液胞H ⁺ -ATPアーゼV0 ドメイン 36 KD サブユニット: H ⁺ -ATPase V0 domain 36 KD subunit, vacuolar
	DEL011	YGL240W	06.07 06.13.01	後期促進因子成分: component of the anaphase promoting complex
	DEL013	YGR105W	06.10	ATPアーゼ内膜アセンブリータンパク質: ATPase assembly integral membrane protein
	DEL018	YGL206C	06.04	クラトリン重鎖: clathrin heavy chain
	DEL020	YKL119C	06.10	H ⁺ -ATPアーゼアッセンブリータンパク質: H ⁺ -ATPase assembly protein

【表 2 - 5】

	DEL047	YLR306W	06.07	2ユビキチン結合酵素 : E2 ubiquitin-conjugating enzyme
	DEL061	YGL227W	06.13.04	ヒト RANBPM NP_005484.1 (弱類似) : weak similarity to human RANBPM NP_005484.1
	DEL063	YGR270W	06.13.01	26Sプロテアソームサブユニット : 26S proteasome subunit
細胞内輸送 08 . . CELLULAR TRANSPORT AND TRANSPORT MECHANISMS	DEL000	YPR036W	08.13	液胞H ⁺ -ATPアーゼ V1 ドメイン 54 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V1 domain 54 KD subunit, vacuolar
	DEL002	YDR027C	08.07	VP51-54複合サブユニット、酵母後期ゴルジ体におけるタンパク質選別に必須 : subunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi
	DEL006	YHR039C-A	08.13	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V0 ドメイン 13 KD サブユニット : H ⁺ -transporting ATPase V0 domain 13 KD subunit, vacuolar
	DEL007	YKL080W	08.13	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V1 ドメイン 42 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V1 domain 42 KD subunit, vacuolar
	DEL008	YLR447C	08.13	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V0 ドメイン 36 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V0 domain 36 KD subunit, vacuolar
	DEL018	YGL206C	08.19	クラスリン重鎖 : clathrin heavy chain
	DEL021	YKR082W	08.01	核膜孔タンパク : nuclear pore protein
	DEL046	YLR292C	08.99	ERタンパク質膜通過複合サブユニット : ER protein-translocation complex subunit
	DEL054	YBL063W	08.22	キネシン関連タンパク : kinesin-related protein

【表 2 - 6】

細胞内環境 調節／相互 作用 13 ... REGUL ATION OF / INTERACTION WITH CELLU LAR ENVIRON MENT	DEL000	YPR036W	13.01.01.03	液胞H ⁺ -ATPアーゼ V1 ドメイン 54 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V1 domain 54 KD subunit, vacuolar
	DEL006	YHR039C-A	13.01.01.03	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V0 ドメイン 13 KD サブユニット : H ⁺ -transporting ATPase V0 domain 13 KD subunit, vacuolar
	DEL007	YKL080W	13.01.01.01	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V1 ドメイン 42 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V1 domain 42 KD subunit, vacuolar
	DEL008	YLR447C	13.01.01.03	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V0 ドメイン 36 KD サブユニット : H ⁺ -ATPase V0 domain 36 KD subunit, vacuolar
	DEL059	YGL071W	13.01.01.01	鉄調節転写抑制因子 : iron-regulated transcriptional repressor
	DEL065	YIR026C	13.11.03.01	チロシンフォスファターゼ : protein tyrosine phosphatase
細胞フェイト 14 ... CELL FATE	DEL001	YDL151C	14.04.03.01	双極性出芽サイト選抜に関連 : involved in bipolar bud site selection
	DEL015	YBL058W	14.04.03.01	Glc7p ポテンシャル調節サブユニット : potential regulatory subunit for Glc7p
	DEL021	YKR082W	14.04.03.05	Glc7p ポテンシャル調節サブユニット : potential regulatory subunit for Glc7p
	DEL032	YDL151C	14.04.03.01	双極性出芽サイト選抜に関連 : involved in bipolar bud site selection
	DEL049	YOL068C	14.04.03.03	遺伝子抑制タンパク質 : silencing protein

【表 2-7】

	DEL073	YLR307W	14.04.03.05	胞子形成-キチンデアセチラーゼ : sporulation-specific chitin deacetylase
	DEL080	YMR032W	14.01 14.04.03.01	細胞分裂に関与: involved in cytokinesis
	DEL082	YPL129W	14.04.03.03	TFIIFサブユニット (転写イニシエーション因子), 30 kD: TFIIF subunit (transcription initiation factor), 30 kD
細胞の組織 調節 30 .. CONTR OL OF CELLU LAR ORGANIZ ATION	DEL002	YDR027C	30.01 30.04.03	VP51-54複合体サブユニット、酵母後期ゴルジ体におけるタンパク質選別に必須: subunit of VP51-54 complex, required for protein sorting at the yeast late Golgi
	DEL034	YDR414C	30.01	内膜輸送タンパク質 Putative transport protein of inner membranes
	DEL048	YLR381W	30.10.03	アウターキネトコア: outer kinetochore protein
	DEL062	YGR084C	30.16	ミトコンドリアリボソームタンパク質、小サブユニット: mitochondrial ribosomal protein, small subunit
	DEL080	YMR032W	30.04	細胞分裂に関与: involved in cytokinesis
輸送促進— 67 .. TRANS PORT FACILI TATION	DEL000	YPR036W	67.04.01.02 67.50.22	液胞H ⁺ -ATPアーゼ V1 ドメイン 54 KD サブユニット: H ⁺ -ATPase V1 domain 54 KD subunit, vacuolar
	DEL005	YHR026W	67.04.01.02 67.50.22	液胞H ⁺ -ATPアーゼ 23 KD サブユニット: H ⁺ -ATPase 23 KD subunit, vacuolar
	DEL006	YHR039C-A	67.04.01.02 67.50.22	液胞H ⁺ -輸送 ATPアーゼ V0 ドメイン 13 KD サブユニット: H ⁺ -transporting ATPase V0 domain 13 KD subunit, vacuolar

【表 2-8】

	DEL016	YCR028C	67.21	パントテン酸パーミアーゼ : Pantothenate permease
	DEL046	YLR292C	67.99	ERタンパク質膜通過複合サブユニット : ER protein-translocation complex subunit
未分類蛋白 UNCLASSIFIED PROTEINS	DEL053	YBL056W	98.	セリン/スレオニン タンパク質 フォスファターゼ PP2C : ser/thr protein phosphatase PP2C
	DEL017	YDR149C	99.	
	DEL024	YLR285W	99.	A. thaliana 仮説タンパク (弱類似)): weak similarity to A. thaliana hypothetical protein
	DEL025	YLR311C	99.	S. tarentolae のクリプトジーンタ ンパク質 G4 (弱類似) : weak simi larity to S. tarentolae cryptog ene protein G4
	DEL029	YOR331C	99.	
	DEL030	YPR123C	99.	
	DEL035	YDR525W-A	99.	PMP3/SNA1 (類似)
	DEL036	YDR539W	99.	E. coli rfah-rfe 遺伝子間の仮説 タンパク質 55.3 kDa (類似 : simil arity to E. coli hypothetical 5 5.3 kDa protein in rfah-rfe in tergenic region
	DEL037	YDR540C	99.	大腸菌未解読遺伝子 (類似 : simil arity to E. coli unknown gene
	DEL039	YGL246C	99.	C. elegans ドム-3 タンパク質 (弱類 似) : weak similarity to C. eleg ans dom-3 protein
	DEL041	YJL204C	99.	SNARE Snc1p リサイクルに関連 : in volved in recycling of the SNA RE Snc1p
	DEL042	YLR282C	99.	

【表 2-9】

	DEL067	YJL192C	99.	酵母細胞膜[H ⁺]ATPアーゼのER輸送促進、Pna1: facilitates ER export of the yeast plasma membrane [H ⁺]ATPase, Pna1
	DEL088	YJL211C	99.	
	DEL069	YKLO37W	99.	C.elegans ubc-2タンパク(弱類似): weak similarity to C.elegans ubc-2 protein
	DEL072	YLR283W	99.	Smc2p(弱類似): weak similarity to Smc2p
	DEL074	YLR312C	99.	仮説タンパク: hypothetical protein
	DEL075	YLR315W	99.	ラット アポリポタンパク A-IV(弱類似): weak similarity to rat apolipoprotein A-IV
	DEL078	YLR320W	99.	仮説タンパク: hypothetical protein
	DEL081	YPL030W	99.	C.elegans 仮説タンパク(類似): similarity to C.elegans hypothetical protein

【0014】

さらに、以下の実施例にて試験した12種類の化学物質のうち7種類以上の化学物質に感受性を示した遺伝子破壊株を機能から分類すると、表3のようになる。

【0015】

表3. 機能による分類

【表 3】

機能	遺伝子破壊株数
代謝-アミノ酸代謝(01.01)	2
代謝-C-化合物および炭水化物代謝(01.05)	1
脂質、脂肪酸およびイソプロパノイド代謝(01.06)	3
細胞周期とDNAプロセッシング-DNAプロセッシング(03.01)	2
細胞周期とDNAプロセッシング-細胞周期(03.03)	4
転写-mRNA転写(04.05)	5
蛋白フェイト(フォールディング、修飾、デスチネーション)-蛋白修飾(06.07)	1
蛋白フェイト(フォールディング、修飾、デスチネーション)-蛋白複合体のアセンブル(06.10)	4
細胞内輸送と輸送機構-液胞輸送(08.13)	3
細胞内環境調節/相互作用-イオン性ホメオスタシス(13.01)	3
細胞フェイト-細胞分化(14.04)	3
輸送促進-イオントランスポーター(67.04)	4
輸送促進-輸送機構(67.50)	4
未分類蛋白(99)	4

【0016】

同じ遺伝子が重複する機能を有する場合は、重複してカウントした。特に、細胞内輸送と輸送機構—液胞輸送 (08.13)、細胞内環境調節／相互作用—イオン性ホメオスタシス (13.01)、輸送促進—イオントランスポーター (67.04)、輸送促進—輸送調節 (67.50) は重複が多かった。

特に、細胞内輸送と輸送機構—液胞輸送 (08.13)、細胞内環境調節／相互作用—イオン性ホメオスタシス (13.01)、輸送促進—イオントランスポーター (67.04)、輸送促進—輸送機構 (67.50) は遺伝子が重複しているが、上位 10 遺伝子のうち、50%がこのカテゴリーに入ったため、本検討により化学物質の解毒には液胞が重要な役割を果たすことが確認された。また、転写—mRNA 転写 (04.05)、細胞周期と DNA 合成—細胞周期 (03.03)、細胞フェイト—細胞分化 (14.04)、細胞周期と DNA 合成—DNA 合成 (03.01)、蛋白フェイト (フォールディング、修飾、デスチネーション)—蛋白複合体のアセンブル (06.10)、代謝—アミノ酸生合成 (01.01)、代謝—C-結合、炭水化物代謝 (01.05)、脂質、脂肪酸、イソプロパノイド代謝 (01.06) も化学物質の応答に深く関与することがわかった。さらに、機能が知られていない遺伝子の有用性が確認された。

【0017】

本発明は酵母以外の微生物も用いることができる。ここに微生物は、例えばヒト、マウスその他の哺乳類由来の動物細胞および動物細胞の樹立株、これまでバイオアッセイに用いられている魚類、線虫等の細胞、昆虫細胞、酵母等の真菌細胞、および大腸菌等の細菌細胞の何れであっても良い。そして公知のデータベース等を利用して上記酵母において見出された機能を有する遺伝子に相当する遺伝子の破壊株を公知の手法により作成すれば、本発明の方法に利用できる。特に、上記表 2：機能による分類において「機能 (description)」として記載している機能に相当する遺伝子が破壊株における破壊遺伝子の対象とすることができる。

【0018】

(2) 選別した遺伝子破壊株の使用

特定の遺伝子を破壊することにより、微生物は化学物質に対して感受性または耐性を示すことがある。本発明は、化学物質に対する感受性が向上している遺伝子破壊株を選択し、化学物質の検定に利用する。化学物質の存在は、遺伝子破壊株の化学物質に対する細胞応答を指標として検定する。化学物質に対する細胞応答とは細胞の生死、増殖能、呼吸量、酵素活性、遺伝子発現の変化を示す。

ここに、「細胞の生死」は生細胞の割合や ATP 量により、「増殖能」は細胞数の増加割合により、「呼吸量」は酸素の消費量により、「酵素活性」は元来、指標細胞が有する酵素活性の測定により、「遺伝子発現の変化」は RNA 量または mRNA 量の測定により、評価することができる。また、本発明では、特定の遺伝子発現の変化の測定として、ノザン・ブロッティング法 (細胞の分子生物学 第 2 版、教育社、1990 年発行、189～191 ページ) やプロモーターアッセイ法で測定する特定遺伝子の発現量測定方法も利用できる。

中でも細胞の生死、増殖能、呼吸量、特定の遺伝子の発現の変化をプロモーターアッセイにより測定する方法が、操作が簡便なのでバイオアッセイに適している。

【0019】

(3) キット

本発明のキットには上記遺伝子破壊株の乾燥品、例えば凍結乾燥品、L 乾燥品または凍結品を含む容器、培養培地等が含まれる。

培養培地としては、用いる遺伝子破壊株に適した組成を有する培地を用いる。

【0020】

(4) 組成物

本発明は別の態様として、被検試料中に化学物質が存在するか否かを検定するための、微生物の遺伝子破壊株を含む組成物を提供する。典型的には本発明組成物は、上記遺伝子破壊株を含む培養培地である。

【実施例】

【0021】

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例 1

ケミカルプレートにおける生育阻害を指標とした遺伝子破壊株の化学物質感受性試験

a) 方法

酵母遺伝子破壊株はYeast Deletion Homozygous Diploid (YKO Plate sets: Yeast Deletion Homozygous Diploid complete set, ResGen™, Invitrogen) を使用した。この遺伝子破壊株の親株はSaccharomyces crevisiae BY4743である。酵母の遺伝子破壊株6000種類の中から、化学物質感受性となりうる破壊株を複数選択する。実際の遺伝子破壊株は遺伝子の種類によっては欠損すると生育出来ないものがある。そこで、本実験の対象はHomozygous diploids (ホモ接合二倍体) として生育可能な遺伝子破壊株約4800種類を選択した。

【0022】

凍結保存された遺伝子破壊株をYPD培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%）にて25℃において振盪培養することにより定常状態になるように増殖させた。定常状態の細胞を上記同じ培地で10000倍希釈し、化学物質含有寒天培地（ケミカルプレート）に1.5μLずつ滴下し、3日後にコロニーの形成を観察した。ケミカルプレートはYPD寒天培地（酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%、寒天2%）に最終濃度が表4になるように化学物質を付加して作成した。

【0023】

表4. ケミカルプレートによる遺伝子破壊株の感受性実験の化学物質

【表4】

No	化学物質	濃度		
C001P	塩化メチル水銀	0.07μM	0.2μM	0.6μM
C002P	亜ヒ酸ナトリウム	0.3mM	1mM	3mM
C003P	塩化第一ニッケル	1mM	3mM	9mM
C004P	二クロム酸カリウム	0.3mM	1mM	3mM
C005P	トリフェニルスズ=クロライド	0.007mM	0.02mM	0.06mM
C006P	塩化第二水銀	0.033mM	0.1mM	0.3mM
C007P	硫酸銅	2.67mM	8mM	24mM
C008P	シアン化カリウム	6mM	18mM	54mM
C009P	塩化鉛	0.67mM	2mM	6mM
C010P	SDS	0.003%	0.01%	0.03%
C011P	DMSO	1%	3%	9%
C012P	塩化亜鉛	3.3mM	10mM	30mM

【0024】

b) 結果

約4800種類の遺伝子破壊株について化学物質感受性の実験を行った。試験結果から、各々の遺伝子破壊株について感受性を示した化学物質数を算出して表5にまとめた。ここで、感受性を示すとは、2濃度以上で生育阻害が見られたものを指す。

表5. 化学物質について感受性を示す遺伝子破壊株数

【表 5】

感受性を示した 化学物質の数	遺伝子破壊株の 数
0	4149
1	348
2	135
3	59
4	61
5	32
6	21
7	16
8	6
9	8
10	1
11	0
12	0

【0025】

遺伝子破壊株約 4800 のうち、10 種類の化学物質に感受性を示す遺伝子破壊株数は 1、9 種類の化学物質に対しては 8、8 種類の化学物質に対しては 6、7 種類の化学物質に対しては 16、6 種類の化学物質に対しては 21、5 種類の化学物質に対しては 32、4 種類の化学物質に対しては 61、3 種類の化学物質に対しては 59、2 種類の化学物質に対しては 135、1 種類の化学物質の化学物質に対しては 348 あり、化学物質に全く感受性を示さないものは 4149 であった。特に 5 以上の化学物質に感受性を示す遺伝子破壊株を表 6 に示す。

【0026】

表 6. 5 以上の化学物質に感受性を示した遺伝子破壊株

【表 6-1】

No	遺伝子	2 濃度以上で生育阻害を示した化学物質の数	1 濃度で生育阻害を示した化学物質の数
DEL000	YPR036W	10	1
DEL001	YDL151C	9	2
DEL002	YDR027C	9	2
DEL003	YGL026C	9	2
DEL004	YGR180C	9	1
DEL005	YHR026W	9	1
DEL006	YHR039C-A	9	2
DEL007	YKL080W	9	2
DEL008	YLR447C	9	2
DEL009	YDR127W	8	2
DEL010	YDR150W	8	1
DEL011	YGL240W	8	3
DEL012	YGR006W	8	2
DEL013	YGR105W	8	1
DEL014	YJR104C	8	0
DEL015	YBL058W	7	5
DEL016	YCR028C	7	4
DEL017	YDR149C	7	5
DEL018	YGL206C	7	5
DEL019	YIL036W	7	4
DEL020	YKL119C	7	3
DEL021	YKR082W	7	2
DEL022	YLR226W	7	2
DEL023	YLR284C	7	3
DEL024	YLR285W	7	4
DEL025	YLR311C	7	4
DEL026	YML112W	7	4
DEL027	YMR021C	7	2
DEL028	YOR221C	7	3
DEL029	YOR331C	7	3
DEL030	YPR123C	7	3
DEL031	YAL021C	6	5

【表 6-2】

DEL041	YJL204C	6	4
DEL042	YLR282C	6	4
DEL043	YLR287C	6	2
DEL044	YLR287C-A	6	3
DEL045	YLR290C	6	3
DEL046	YLR292C	6	3
DEL047	YLR306W	6	5
DEL048	YLR381W	6	5
DEL049	YOL068C	6	3
DEL050	YOR026W	6	1
DEL051	YPL018W	6	4
DEL052	YBL042C	5	2
DEL053	YBL056W	5	2
DEL054	YBL063W	5	2
DEL055	YBR279W	5	3
DEL056	YDR148C	5	4
DEL057	YDR363W-A	5	2
DEL058	YGL070C	5	1
DEL059	YGL071W	5	4
DEL060	YGL222C	5	3
DEL061	YGL227W	5	0
DEL062	YGR084C	5	3
DEL063	YGR270W	5	2
DEL064	YHL025W	5	3
DEL065	YIR026C	5	2
DEL066	YJL188C	5	3
DEL067	YJL192C	5	4
DEL068	YJL211C	5	4
DEL069	YKL037W	5	5
DEL070	YLR234W	5	3
DEL071	YLR266C	5	4
DEL072	YLR283W	5	4
DEL073	YLR307W	5	6
DEL074	YLR312C	5	5
DEL075	YLR315W	5	3

【0027】

実施例 2

プロモーターアッセイを用いた遺伝子破壊株の検出感度の検討
方法

1) 遺伝子破壊株の選択

遺伝子破壊株は破壊された遺伝子によっては生育速度が非常に遅くなることや生育可能な培地成分が異なる場合がある。そこで、プロモーターアッセイ法の宿主細胞を検討する本実験においては対照実験との比較しやすさを考慮して、実施例 1 の結果得られた遺伝子破壊株の中で、多くの化学物質に対する感受性を有し、かつ親株と同様の操作で生育する数株を選択した。選択した遺伝子破壊株は、表 6 における DEL000、DEL002、DEL011、DEL014、DEL016、DEL019、DEL022、DEL025 の 8 株である。さらに、対照として親株の BY4743 を用いた。

【0028】

2) 形質転換体の作成

遺伝子破壊株の親株および選択した遺伝子破壊株各々のコンピテントセルを作成した。このコンピテントセルを、作成したプロモーターアッセイ用の2種類のプラスミド、p-YBR072W (YBR072Wのプロモーターの下流にGFPを連結) およびp-YPL171C (YPL171Cのプロモーターの下流にGFPを連結) を用いて形質転換した。

詳細には、p-YBR072Wを次の手法により調製した。

酵母遺伝子YBR072Wのプロモーター配列を含むポリヌクレオチド (SCPD: The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae*にて開示) (配列番号1) をPCRにより増幅するためのプライマーを作成した。プライマーはプライマー設計用のソフトウェアであるOligo4.0-S, SequencherIマッキントッシュ版を用いて設計し、アッパープライマーの塩基配列は、

GCAGTCAACGAGGAGCGAATCAG (配列番号2)

であり、ロウワープライマーの塩基配列は、

GTTAATTTGTTTAGTTTGTTC (配列番号3)

とした。PCRはテンプレートとして酵母の染色体 (*Saccharomyces cerevisiae* S288C, Cat. 40802, Reserch Genetics, Inc.) を用い、試薬は市販のキット (KOD DNA Polymerase; コードKOD-101, Toyobo) を使用した。

使用するベクターは大腸菌と酵母の両方で複製されるYEp型シャトルベクターであるpYES2 (pYES2, Cat no: V825-20, Invitrogen Corporation, USA) (R.W. オールド, S.B. プリムローズ 遺伝子操作の原理 原書第5版, 培風館, pp. 234-263, 2000) を用いた。また、マーカータンパク質GFPをコードするポリヌクレオチドはベクターpQBI 63 (Cat no. 54-0082, 和光純薬工業(株)) のGFPの部分 (配列番号4) を用いた。まず、pYES2の多重クローニング部位 (multiple cloning site) の中にGFPのポリヌクレオチドを挿入したベクターを作成した。次いで、pYES2のGAL1プロモーターの部分に酵母遺伝子であるYBR072Wのプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと置換し、目的とするプラスミドベクターを得た。GFPおよびプロモーター配列を含むポリヌクレオチドの挿入操作は、適当な制限酵素を選択して行った。

【0029】

次に、このプラスミドベクターで酵母*Saccharomyces cerevisiae* BY4743 (YKO Plate sets: Yeast Deletion Homozygous Diploid complete set, ResGenTM, Invitrogen) を形質転換した。形質転換の手順を以下に示す。

1) 酵母細胞*Saccharomyces cerevisiae* BY4743をYPD培地200mlにてOD660が0.5になるまで振とう培養する。

2) 集菌して5mlのTE-bufferに懸濁する。

3) 2.5Mのリチウムアセテイト250 μ Lを添加する。

4) 300 μ lずつ分注し10 μ lの上記プラスミドベクターを添加し、30℃30分培養する。

5) 700 μ lの50%PEG4000を添加し、30℃60分振とう培養する。

6) ヒートショック (42℃、5分) 後、急冷する。

7) 1Mソルビトールで2回洗浄する。

8) 最小栄養培地 (SD培地に必要なアミノ酸 (ヒスチジン、ロイシン) を加えたもの) で作成した寒天プレートに播種する。

【0030】

形質転換の確認は選択培地 (SD培地 (Yeast nitrogen base without amino acids (Difco 0919-15) + グルコース + アミノ酸 (ヒスチジン、ロイシン) により行った。選択培地の寒天プレートに生育したコロニーはさらに、アミノ酸の栄養要求性を確認した。

【0031】

p-YPL171Cは次のようにして調製した。

酵母遺伝子YPL171Cのプロモーター配列を含むポリヌクレオチド (SCPD: The Promoter

Database of *Saccharomyces cerevisiae*にて開示) (配列番号5)をPCRにより増幅するためのプライマーを作成した。プライマーはプライマー設計用のソフトウェアであるOligo4 .0-S, SequencherIマッキントッシュ版を用いて設計し、アッパープライマーの塩基配列は、

ACGCCCCTTCCTTTTCCCTTTC (配列番号6)

であり、ロウワープライマーの塩基配列は、

CTTCTAAATTTAAACTTCGCTA (配列番号7)

とした。PCRはテンプレートとして酵母の染色体 (*Saccharomyces cerevisiae* S288C, Cat .40802, Reserch Genetics, Inc.) を用い、試薬は市販のキット (KOD DNA Polymerase; コードKOD-101, Toyobo) を使用した。

使用するベクターは大腸菌と酵母の両方で複製されるYEp型シャトルベクターである pYES2 (pYES2, Cat no:V825-20, Invitrogen Corporation, USA) (R.W. オールド、S.B. プリムローズ 遺伝子操作の原理 原書第5版, 培風館, pp.234-263, 2000)) を用いた。また、マーカータンパク質 GFP をコードするポリヌクレオチドはベクター pQBI 63 (Cat no.54-0082, 和光純薬工業(株)) の GFP の部分 (配列番号4) を用いた。まず、pYES2の多重クローニング部位 (multiple cloning site) の中に GFP のポリヌクレオチドを挿入したベクターを作成した。次いで、pYES2のGAL1プロモーターの部分を酵母遺伝子である YPL171Cのプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと置換し、目的とするプラスミドベクターを得た。GFPおよびプロモーター配列を含むポリヌクレオチドの挿入操作は、適当な制限酵素を選択して行った。

【0032】

次に、このプラスミドベクターで酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 (YKO Plate sets: Yeast Deletion Homozygous Diploid complete set, ResGenTM, Invitrogen) を形質転換した。形質転換の手順を以下に示す。

- 1) 酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743をYPD培地200mlにてOD660が0.5になるまで振とう培養する。
- 2) 集菌して5mlのTE-bufferに懸濁する。
- 3) 2.5Mのリチウムアセテイト250 μ Lを添加する。
- 4) 300 μ lずつ分注し10 μ lの上記プラスミドベクターを添加し、30℃30分培養する。
- 5) 700 μ lの50%PEG4000を添加し、30℃60分振とう培養する。
- 6) ヒートショック (42℃、5分) 後、急冷する。
- 7) 1Mソルビトールで2回洗浄する。
- 8) 最小栄養培地 (SD培地に必要なアミノ酸 (ヒスチジン、ロイシン) を加えたもの) で作成した寒天プレートに播種する。

【0033】

形質転換の確認は選択培地 (SD培地 (Yeast nitrogen base without amino acids (Difco 0919-15)+グルコース+アミノ酸 (ヒスチジン、ロイシン) により行った。選択培地の寒天プレートに生育したコロニーはさらに、アミノ酸の栄養要求性を確認した。

【0034】

3) 化学物質感受性試験

得られた形質転換体をSD培地 (ヒスチジン、ロイシン) にて25℃において振盪培養することにより定常状態になるように増殖させた。定常状態の形質転換体を上記同じ培地で500倍希釈して25℃、15時間振盪培養を行い対数増殖期として600nmの吸光度が0.2から0.5であることを確認した後、異なる濃度の化学物質を負荷した。化学物質負荷後、4時間培養した細胞の蛍光をフローサイトメーター (FITCフィルター, EPICS XL-MCL, Bechmancoulter) を用いて計測し、マーカー遺伝子である GFP (green fluorescence protein) の発現量とした。フローサイトメーターにより1測定で1万個の細胞の蛍光強度を測定し、すべての細胞の蛍光強度の平均値を求め測定値とした。同様に計測した化学物質を負荷しない細胞の蛍光強度を求めて、蛍光強度比として示した。

【0035】

結果

遺伝子破壊株 DEL000、DEL002、DEL011、DEL014、DEL016、DEL019、DEL022、DEL025（表6）を宿主細胞とした場合のプロモーターアッセイ法の検出感度を検討した。負荷する化学物質はBY4743を宿主とした場合に応答を示す、メタ亜ヒ酸ナトリウム、塩化カドミウム、ベンチオカーブおよび塩化水銀(II)を選択して用いた。化学物質の希釈系列を作成して負荷試験を行った結果を図1から5に示す。

図1は、遺伝子破壊株 DEL011 が親株の 1/3 の濃度においてメタ亜ヒ酸ナトリウムに応答したことを示している。

図2は、遺伝子破壊株 DEL011 が親株の 1/10 の濃度、遺伝子破壊株 DEL014 が 1/3000 の濃度、遺伝子破壊株 DEL016 が 1/3 の濃度においてメタ亜ヒ酸ナトリウムに応答したことを示している。

図3は、遺伝子破壊株 DEL002 が親株の 1/3 の濃度、遺伝子破壊株 DEL011 が 1/3 の濃度、DEL016 が 1/3 の濃度、DEL019025 が 1/3 の濃度、遺伝子破壊株 DEL が 1/3 の濃度において塩化カドミウムに応答したことを示している。

図4は、遺伝子破壊株 DEL000 が親株の 1/3 の濃度、遺伝子破壊株 DEL019 が 1/100 の濃度、DEL022 が 1/10 の濃度、遺伝子破壊株 DEL025 が 1/3 の濃度においてベンチオカーブに応答したことを示している。

図5は、遺伝子破壊株 DEL011 が親株の 1/10 の濃度、遺伝子破壊株 DEL016 が 1/3 の濃度において塩化第二水銀に応答したことを示している。

このように、DEL000、DEL002、DEL011、DEL014、DEL016、DEL019、DEL022 および DEL025 は、親株である BY4743 より化学物質に対する応答性が3倍から1000倍高いことが確認された。特に、DEL0014 は親株の検出可能な濃度の 1/1000 の濃度においても BY4743 と比べ有為な差がみられた（図2）。

【産業上の利用可能性】

【0036】

ケミカルプレートによる化学物質感受性試験の結果から遺伝子破壊株を選択し、実際にこれを宿主細胞として化学物質応答遺伝子組換え体細胞を作成し、化学物質応答性を測定した。その結果、化学物質によっては約1000倍の感受性が得られた。このことから、この手法を用いることにより実用の場面で必要な感度を有する宿主細胞の開発の可能性が確認された。

今回の宿主細胞の検討は、化学物質全般に感受性を示す遺伝子破壊株を用いたが、プロモーターアッセイ法に用いる遺伝子およびターゲットとする化学物質によっては、特定の化学物質に感受性を有する方が有利な場合も考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】 プラスミド p-YPL171C により形質転換された遺伝子破壊株 DEL011 におけるメタ亜ヒ酸ナトリウムに対する感受性を示すグラフ。

【図2】 プラスミド p-YBR027W により形質転換された遺伝子破壊株 DEL011、DEL014 および DEL016 におけるメタ亜ヒ酸ナトリウムに対する感受性を示すグラフ。

【図3】 プラスミド p-YBR027W により形質転換された遺伝子破壊株 DEL002、DEL011、DEL016、DEL019 および DEL025 における塩化カドミウムに対する感受性を示すグラフ。

【図4】 プラスミド p-YBR027W により形質転換された遺伝子破壊株 DEL000、DEL019、DEL022 および DEL025 におけるベンチオカーブに対する感受性を示すグラフ。

【図5】 プラスミド p-YPL171C により形質転換された遺伝子破壊株 DEL011、D

EL 0 1 6 および DEL 0 2 5 における塩化第二水銀に対する感受性を示すグラフ。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIKIN INDUSTRIES, LTD.

<120> Method for detecting a chemical Substance with a gene-disrupted microorganism

<130> 190941

<160> 7

<210> 1

<211> 1287

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```

gcagtcaacg aggagcgaat cagacgccag tctttcctcc accaagagct cgatctcttc      60
catattttcc caagataatg actattccat tcacgatttg ttgtacgaag atattgaaga      120
gatggataaa acagacgctt tcaaaattaa caacacaata gcaatcgatg attctaaagc      180
tctctttgtc ttctgttcaa acgactcctc ctcaaggaca gcgtctatcg aaacattgca      240
cgaatcaaat ttggacaacc tggatatggg ttccagtaga aggacatcgt tggacttttt      300
ttaatataac ctaccatagg acacactttg ttgttgatgt tggacaattc gttaattaag      360
agtccttaaa cggctctact agttccaacc tcactttgtt ttttcatttt tttatgtttt      420
ttctagaacc ttctttacgt gattctcgct cggaatccgt caatagaatg ttttcagtct      480
ccgtttcaat attctgcgca catcaatcat tttcttacta catacactaa cattactcct      540
agtttaattt aattgaattt ttaactttct tttcttttca tttggcaatt tggctccttg      600
aaaacaagac tatgggtctc tctcataagc ctcaagggggg gaccccaaaa aaataacgcg      660
gccatcttgc atgcaccgtt gaacctgtag cttacagtaa gccacaattc tcttaccttc      720
ttggcaatgt ggcacaaaat aatctgggta tgtgtcttca tttggtaatc actgggatgt      780
tactggggca gcagcaactc cgtgtgtacc cctaactccg tgtgtacccc taaagaacct      840
tgcctgtcaa ggtgcattgt tggatcgga tagtaaccgt ctttacatga acatccacaa      900
ccaacgaaag tgctttttca agcattgctt gatttctaga aagatcgatg gttattccct      960
cccccttatg cgtccaaaaa tatagggtgc tcgtaacagt aaggatttcg cacttagcgt     1020
gctcgcaaca caaaattaag taatatgcga gtttttagatg tccttgcgga tctatgcacg     1080
ttcttgagtg gtatttcata acaacgggtc tttttcacc ttattcctaa acatataaat     1140
aggacctcca ttagttagag atctgttttt aatccattca ctttcattc tactctctta     1200
tactaataaa accaccgata aagatatatc agatctctat taaaacaggt atccaaaaaa     1260
gcaaacaac aaactaaaca aattaac                                     1287

```

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gcagtcaacg aggagcgaat cag

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 3
 gttaatttgt ttagtttggt tg

22

<210> 4
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Aequorea victoria

<400> 4
 atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60
 ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 120
 ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180
 ctagtcacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccga tcatatgaaa 240
 cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300
 ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360
 gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tctgggacac 420
 aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480
 ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540
 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 600
 tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660
 ctctttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 5
 <211> 1466
 <212> DNA
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 5
 acgccccttc ctttttccct ttccttggtg tttgctatta ataaataatg tgcggagctc 60
 aatcgtcata cgttcacgcc aggctccgga atcagagtac caatgcatgg gtacttattc 120
 tcaaaatgct cttgccactc atccagtgcg tcaatctgtt cttttgtcag atcatctaag 180
 ggatcgatag gctgatccca atctttaata acgtccagat cgaaggagtt caatgcaaga 240
 ccacgcgacg catcatggcc tgcaaagtta gtgtatggcc cgcttgacc gtaaaactgc 300
 ctccctcttg tgcagtcgta tactttgccc ctaatagcaa taaatatatt ttcacgtcg 360
 tggccgttaa atttggaag cgctcctagga aagaaattac ccgctactac cggttcacta 420
 cttttattag aatcgtttgt gtttgaggcc ccgttacctg tgagcccggg tggatcctca 480
 cttgttttaa cacctccaaa taacaagttt ttaatgaagg acatttggtc tctataatat 540
 tccgatgtac gtgtgtgtgg ctgatgagat ttagactggg tagactattt gacgcgtcta 600
 ttatagctta ctgcaacaag aaaatgatcg ttgatataa aactctcaga tgtatatatc 660
 gtcttggaag catcgagcat aatacaatac aattcaacaa aaatgcgaga aggcactgat 720
 gtcttgctcg taaagaacca aaaacgcgga cactacgacc gtcttatttc cggtagaaaa 780

agggtacata	cagttgaagg	aacgaagaaa	attaaaatta	gaaaaaaaag	taaaataaaa	840
caaggaaggt	agggtaatat	ggtctcgttt	cctttgtcgc	tccgcaaata	aaggagctta	900
ttcccgcacg	ctcacatggg	aatttgcgcc	aatcacgga	tgtggaaaac	tgatcacgtg	960
cttcgatcgc	caactactga	gcgtcgtccc	acactgatct	ggcacagctt	acctcgcctt	1020
gaaaatttta	atctgtcctg	ctcgtttgtt	gtatattgct	tcttctcaga	atatgcccgc	1080
gataactgac	aaagagggtt	cgacgtttca	gagattctac	tcttgaccac	tgtttcgtgt	1140
agccgctcaa	ggtttatttc	tttcttcttt	aatgttcttg	gcacttaggc	ggctccgtcc	1200
tccgtctgaa	attgccgatc	ctattatttg	cggagggctc	cttagaaggg	ctccttagta	1260
agcagtttgc	gttcctgata	taactccgtt	cagaacaagg	ataaagtcgc	aataaccatt	1320
actaagcaca	gtgttgtaag	taggacaact	cgaacctata	taagggttgt	gaactgtgct	1380
tgattcttgc	ccatcatatg	caaaaaagta	cgtacttgat	atatacaaca	actgtagttc	1440
agtatagcga	agtttaaatt	tagaag				1466

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

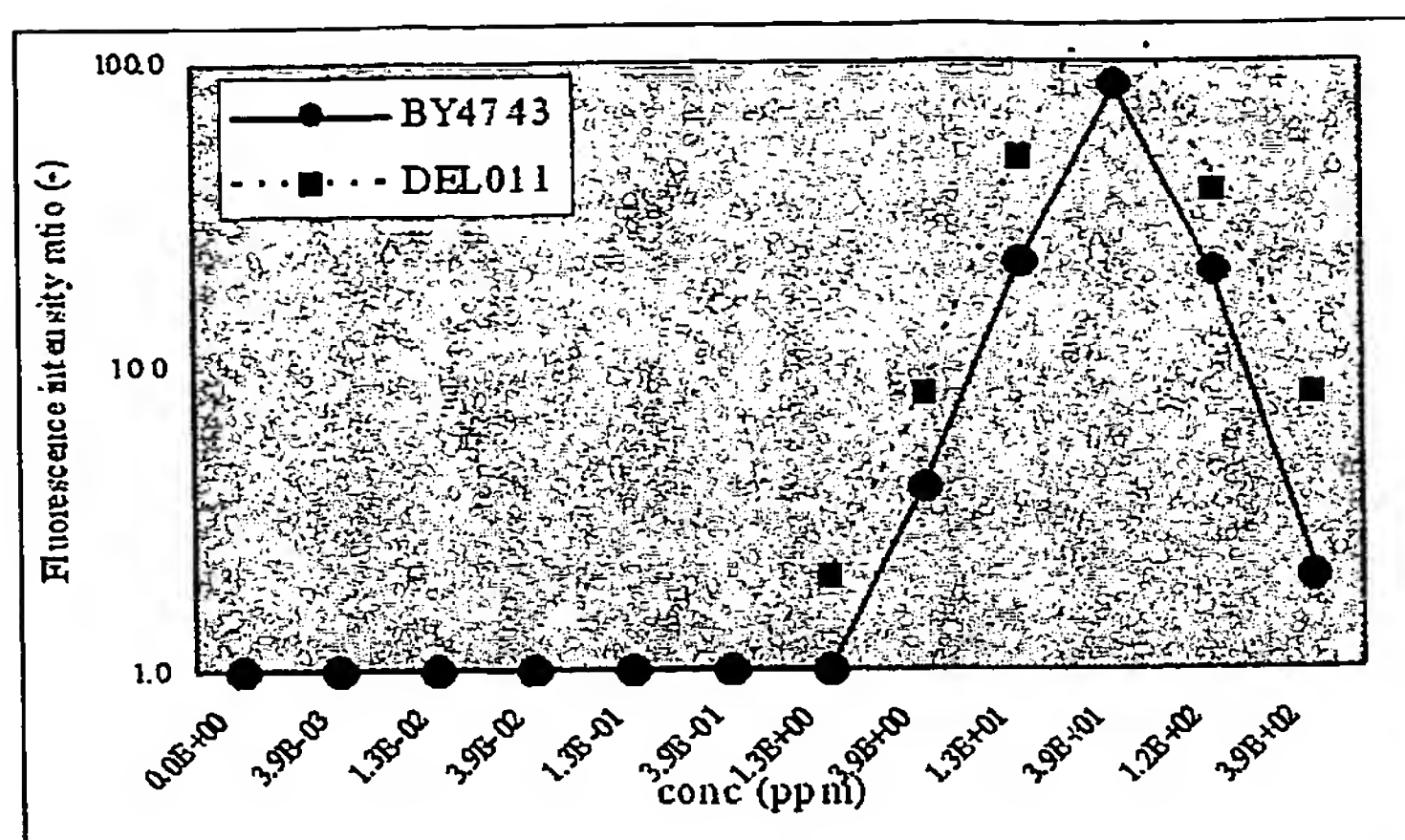
<400> 6	
acgccccttc	ctttttccct ttc
	23

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

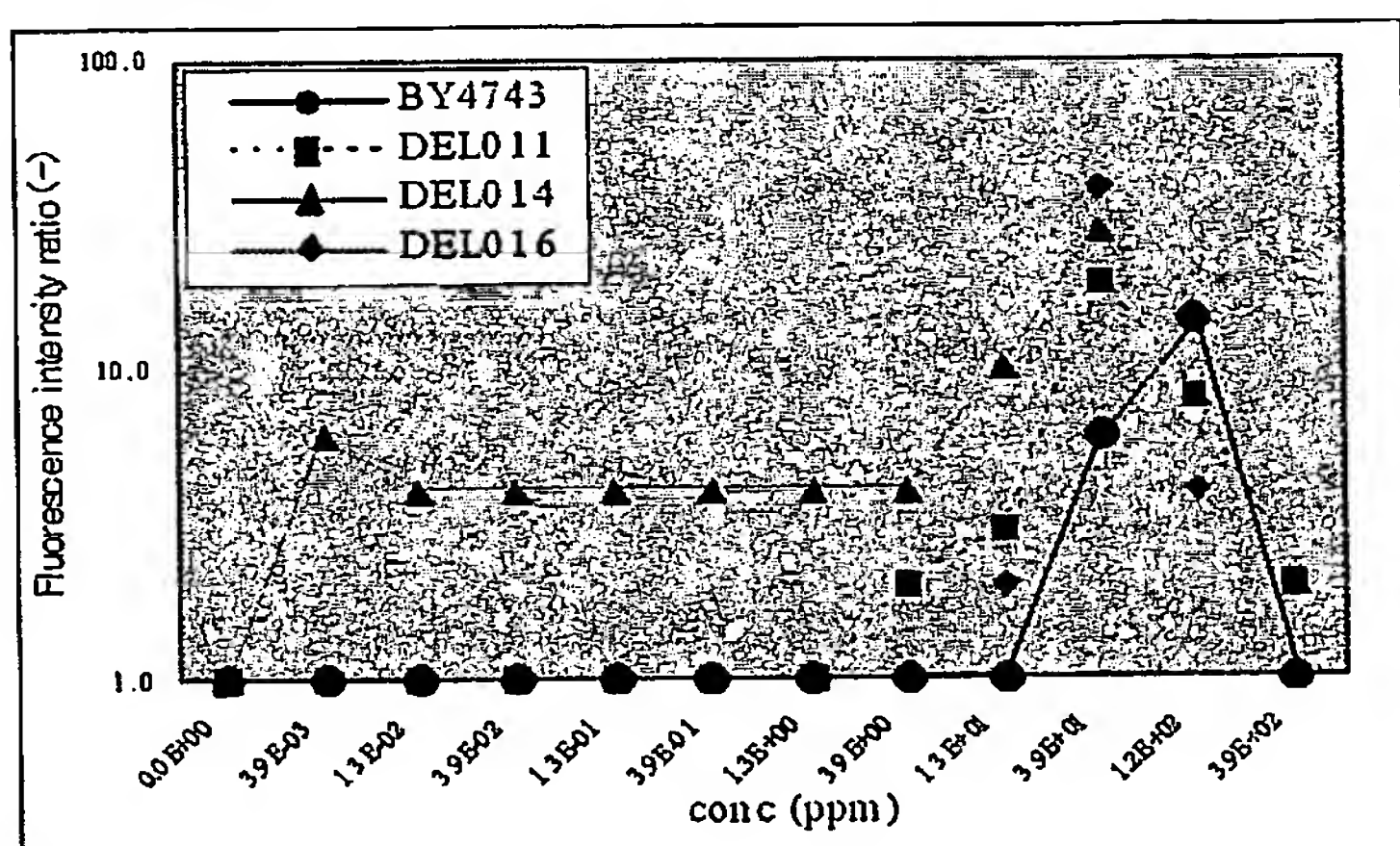
<400> 7	
cttctaaatt	taaacttcgc ta
	22

【書類名】 図面

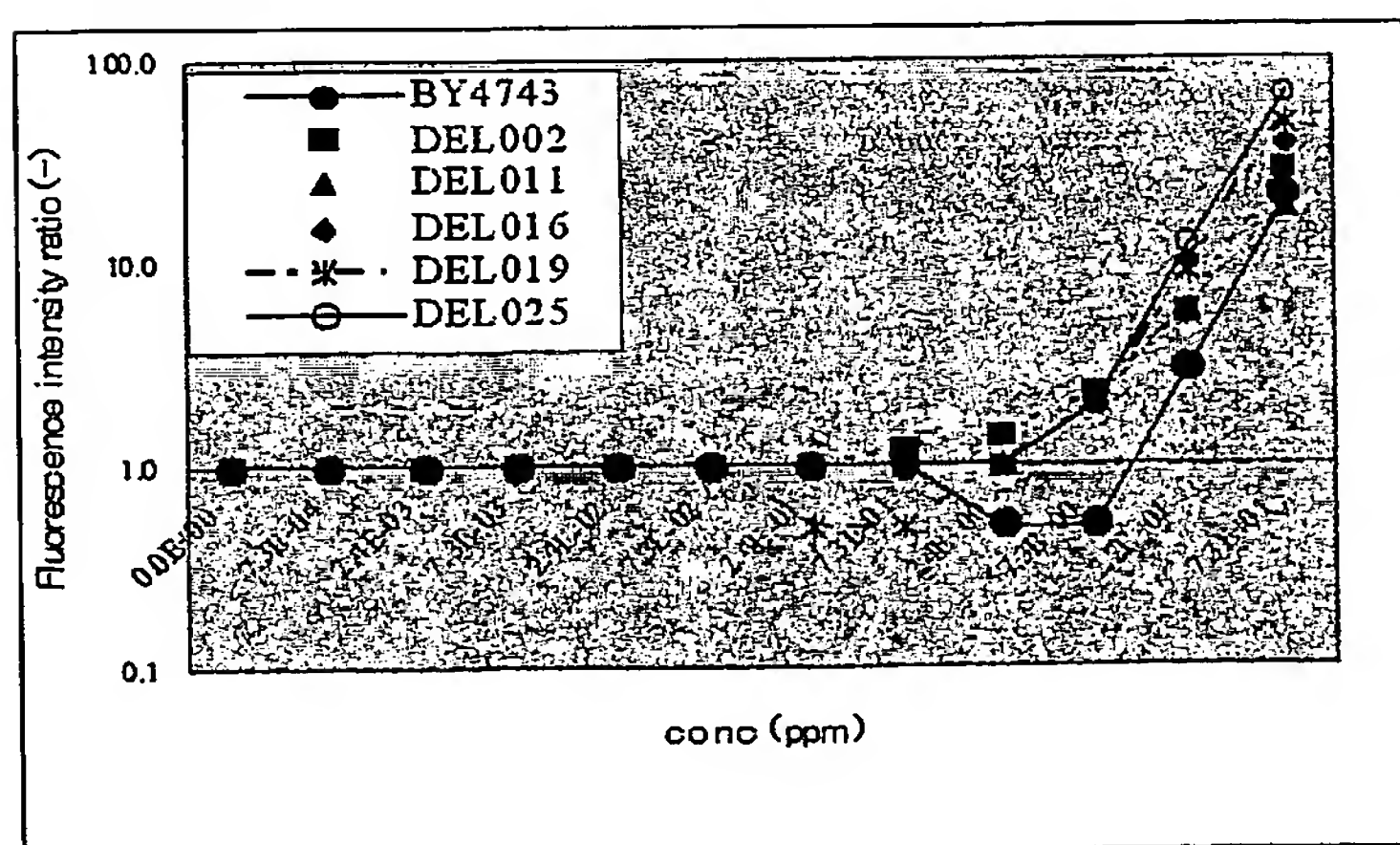
【図 1】



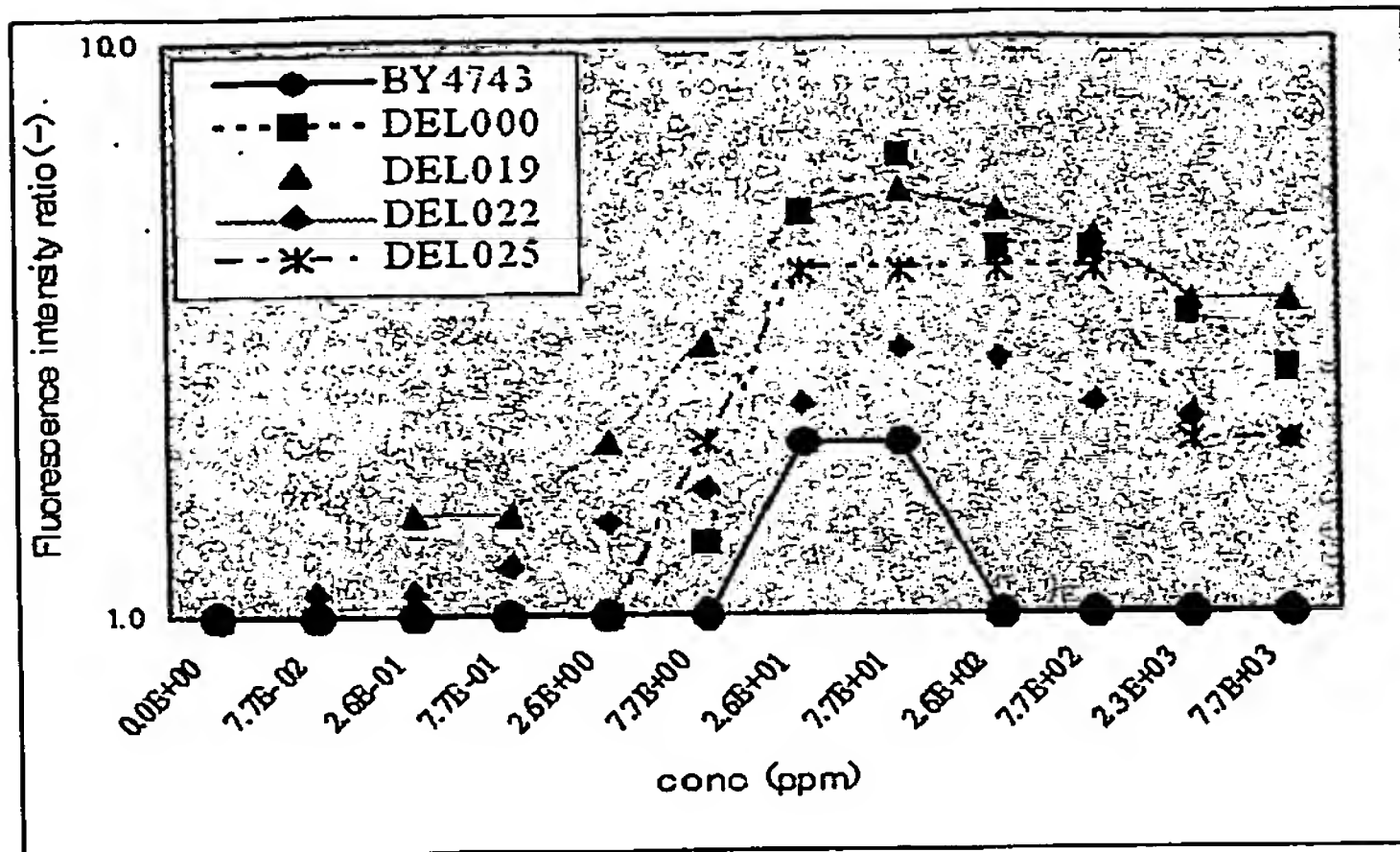
【図 2】



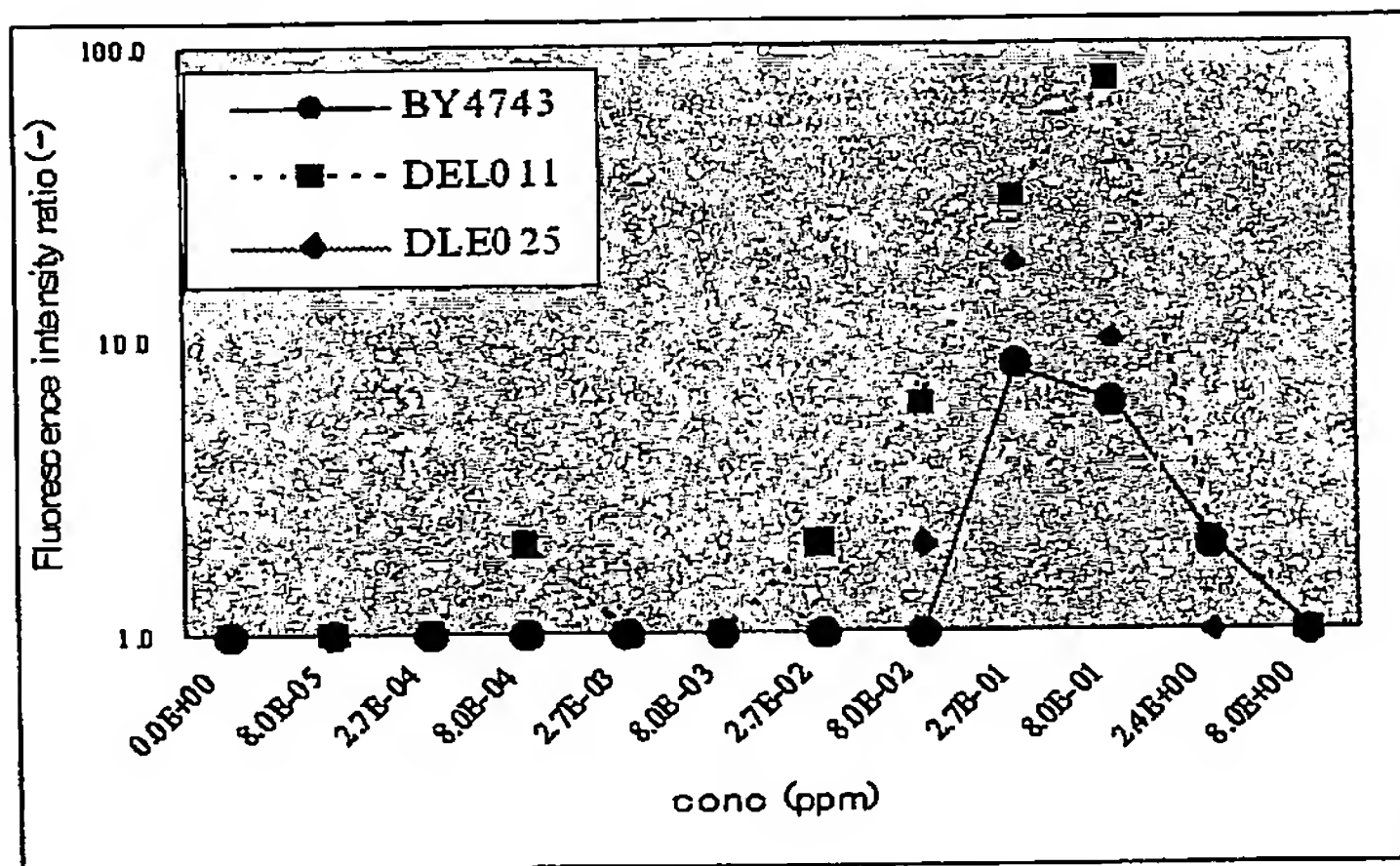
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微生物の毒性応答を利用したバイオアッセイ法において、より高感度の方法を提供する。

【解決手段】 本発明の方法は、特定の遺伝子破壊株を使用することを特徴とする。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 0 3 3 5 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 2 8 5 3]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区中崎西 2 丁目 4 番 1 2 号 梅田センタービル
氏 名	ダイキン工業株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017779

International filing date: 30 November 2004 (30.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-403350
Filing date: 02 December 2003 (02.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.